



UNIVERSITAT DE BARCELONA



SOLVENTS ORGÀNICS EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR I CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS

**Tesi doctoral presentada per
Xavier Subirats i Vila
per optar al grau de
*Doctor per la Universitat de Barcelona***

**Sota la direcció de
Dra. Elisabeth Bosch i José
*Dr. Martí Rosés i Pascual***

Barcelona, 2007

Programa de Doctorat
del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona
QUÍMICA DEL MEDI AMBIENT I DE LA POL·LUCIÓ
(Bienni 2002-2004)

***SOLVENTS ORGÀNICS EN ELECTROFORESI
CAPIL·LAR I CROMATOGRÀFIA DE LÍQUIDS***

Memòria presentada per **Xavier Subirats i Vila**
per optar al grau de **Doctor per la Universitat de Barcelona**

La Dra. Elisabeth Bosch i José i el Dr. Martí Rosés i Pascual,

CERTIFIQUEN

Que la present Tesi Doctoral presentada per Xavier Subirats i Vila ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, 12 de març de 2007

Dra. Elisabeth Bosch i José
Catedràtica del Departament de
Química Analítica de la Universitat de
Barcelona.

Dr. Martí Rosés i Pascual
Catedràtic del Departament de
Química Analítica de la Universitat de
Barcelona.

AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta Tesi Doctoral no hagués estat possible sense el suport acadèmic, institucional i econòmic d'una sèrie de persones i institucions als quals és de justícia agrair la confiança que m'han fet i l'interès que han mostrat en aquest projecte.



En primer lloc és imprescindible agrair als meus directors de Tesi, la Dra. Elisabeth Bosch i el Dr. Martí Rosés, l'oportunitat que han posat al meu abast de poder desenvolupar aquest projecte, l'ajut entregat i la confiança que sempre han mostrat vers aquesta recerca. També és de justícia reconèixer el suport dels companys del Grup d'Interaccions Solut-Solvent, així com el de la resta d'integrants del Departament de Química Analítica. Finalment cal agrair el suport econòmic rebut de la Universitat de Barcelona (beca BRD) i del Ministerio de Ciencia y Tecnología (beca FPI).

Ich bedanke mich bei Prof. Ernst Kenndler vom Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien für die Einladung in seine Forschungsgruppe. In diesem halben Jahr erwarb ich dank Prof. Kenndler und Dr. Simo P. Porras außergewöhnliche Grundkenntnisse über nicht-wässrige Kapillarelektrophorese. Schließlich danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine sehr schöne Zeit.



WHY IS THIS THESIS WRITTEN IN CATALAN?

CATALAN, A EUROPEAN LANGUAGE

Origin, territory and population

The Catalan language, one of the Romance languages, was formed between the VIII and X centuries in the territories of the Carolingian Empire which established the counties of the *Marca Hispànica* to defend the Empire from islamic invasions. During the XII and XIII centuries it spread southwards and westwards with the territorial conquests of the Catalan-Aragonese crown; the language frontier was finally established at the end of the reign of *Jaume I* (James I).

The linguistic domain of the Catalan language covers an area of 68,000 km² and has more than 11 million inhabitants. Nowadays, it is divided into seven territories distributed in four states: Andorra; L'Alguer (Italy); Catalonia, the Balearic Islands, the Community of Valencia and Franja de Ponent –part of Aragon bordering on Catalonia– (Spain); and Northern Catalonia (France).

The knowledge of Catalan

The knowledge of Catalan varies from place to place, due to the diversity of historical and political realities. From the latest data on the degree of linguistic knowledge, it can be deduced that the number of persons capable of speaking Catalan is around 7.5 millions and there are around 10 millions who can understand it.

Catalan, a unique case in Europe

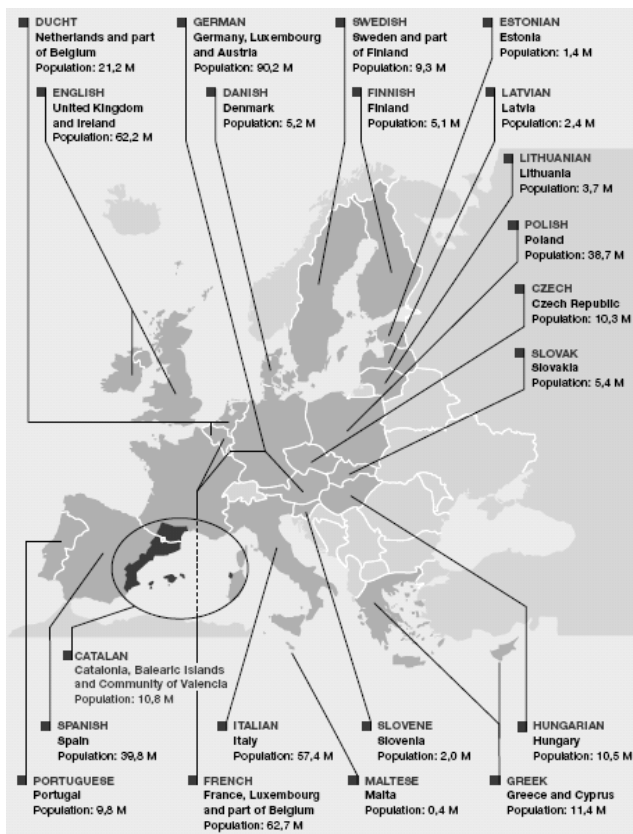
Although Catalan has certain characteristics belonging to minority languages, it differs from them for several reasons which place it among the European languages with a medium-sized population. It is a unique case:

- ✓ Due to its legal status. It is the official language in Andorra and, jointly with Spanish, in three spanish autonomic communities.
- ✓ Due to its demography. It is the eighth language in the European Union. The number of people speaking it is higher than those who speak Finnish or Danish, and is comparable to those who speak Swedish, Greek or Portuguese in Europe.

- ✓ Due to its socio-linguistic situation. It has never actually been lost as a language and is passed down from generation to generation in a normal way.
- ✓ Due to its cultural and literary tradition. Catalan possesses written texts, without interruption, since the XII century. Nowadays, there are over 1,200 living literary authors.

Catalan and the so-called “minority” languages

Generally, Catalan is included in this group of languages even though its reality is far from that of all the others due to its demography, legal statutes, socio-linguistic situation, literary vitality and linguistic equipment.



Catalan and the 20 official languages of the European Union

With respect to the 20 official languages of the European Union, Catalan is the eighth one as far as the number of inhabitants is concerned, ahead of Danish, Swedish, Finnish, Greek, and Hungarian, among others.

Since I was a baby, Catalan has always been the language I have ever listened at home. Catalan was the mother language of my parents and grandparents, and the habitual language in the relations with my friends and relatives. Fortunately my birth coincided with the advent of the democracy in Spain, after about 40 years of dictatorship that systematically persecuted those who spoke or wrote in Catalan. The democracy retrieved the right to the public use of Catalan as a language of cultural and scientific expression, as a normal and official language in the school and university. Nowadays, Catalan is the official language of the public administration in Catalonia, and it is also the language of the University of Barcelona, the one used for administrative purposes and in contacts among public institutions. Although both co-official languages are used in teaching, the use of Catalan is pre-eminent.

Therefore, if all my personal and chemical education has been carried out in Catalan, it should not be surprising that this thesis was written in this language. But the whole thesis is not in Catalan. The scientific development requires the diffusion of the research results at international level, at world-wide scale. Therefore, this thesis includes six papers published in English in international journals. English is the accepted lingua franca of wider communication. It is used as a library language, as the medium of science, technology and international trade, and as a contact language between nations and parts of nations.

In this international and globalized world, it is necessary to have common essential tools of communication. But it is also indispensable to preserve the common features of our particular culture. Regardless of its height or size, any tree needs well fixed roots in the land where it was born.

*Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.
(...) I si la trobes pobra, no és que Ítaca
t'hagi enganyat. Savi, com bé t'has fet,
sabràs el que volen dir les Ítaques.
(...) Més lluny, heu d'anar més lluny
dels arbres caiguts que ara us empresonen,
i quan els haureu guanyat
tingueu ben present no aturar-vos.
Més lluny, sempre aneu més lluny,
més lluny de l'avui que ara us encadena.
I quan sereu deslliurats
torneu a començar els nous passos.
Més lluny, sempre molt més lluny,
més lluny del demà que ara ja s'acosta.
I quan creieu que arribeu, sapigueu trobar noves sendes.*

Adaptació de Lluís Llach (1975) sobre la traducció de Carles Riba del Poema l'obra de Konstantinos P. Kavafis (1911).

Als meus pares, que van noliejat la nau.

A la Susanna, que em va animar a iniciar aquest viatge.

A tots aquells que m'heu ajudat a hissar les veles quan els vents eren favorables, i a arriar-les en acostar-se la tempesta.

Ben mirat, un llibre, és una obra molt col·lectiva.

Dr. Oriol Martí (1995)

PRÒLEG



OBJECTIUS

La cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC) és la tècnica de separació més àmpliament utilitzada, degut a la seva sensibilitat, exactitud de les determinacions quantitatives i aplicabilitat a anàlits no volàtils o termolàbils d'interès científic i industrial. L'electroforesi capil·lar juga un paper fonamental en bioquímica. Aquesta tècnica permet obtenir anàlisis ràpides amb una elevada resolució i un baix consum de reactius auxiliars, fet que minimitza la generació de residus.

L'objectiu principal d'aquest treball en relació a la cromatografia de líquids resideix en l'establiment d'un model que expliqui la variació del pH en fases mòbils hidroorgàniques en funció de la fracció del solvent orgànic. El pH de la fase mòbil condiciona el grau d'ionització dels anàlits amb propietats àcid/base, i en funció d'aquesta ionització es produeixen variacions significatives en la retenció cromatogràfica dels anàlits, que poden afectar notablement la selectivitat. Aquest model s'ha desenvolupat pels dos solvents orgànics més usats en HPLC, acetonitril i metanol, i pels sistemes amortidors més comuns a les concentracions de treball més habituals.

Un cop desenvolupat i avaluat el model, el segon objectiu consisteix en la interpretació i l'estimació dels temps de retenció cromatogràfics d'anàlits amb propietats àcid/base, en termes de la variació dels seus valors de pK_a i del pH de les fases mòbils hidroorgàniques en funció del contingut del solvent orgànic.

En relació a l'electroforesi capil·lar zonal (CZE) el primer objectiu consisteix en la caracterització del nitrometà com a solvent orgànic d'ús en electroforesi capil·lar no aquosa (NACE). El segon objectiu fa referència a la resolució d'un problema analític concret, la separació d'un fàrmac antidepressiu atípic poc soluble en aigua de dos dels seus metabòlits principals, usant electroforesi capil·lar amb solvents no aquosos.

ESTRUCTURA DE LA TESI

La Memòria s'estructura en tres parts. La primera, corresponent al Capítol I, és una introducció general a les dues tècniques d'alta eficàcia estudiades durant el transcurs de la tesi, cromatografia de líquids i electroforesi capil·lar, així com de la problemàtica que comporta l'ús de solvents orgànics. En aquest capítol es defineixen els criteris que ha de presentar un solvent orgànic per tal que sigui apte per a la cromatografia de líquids, i s'introdueix la problemàtica concreta de la mesura del pH en fases mòbils hidroorgàniques. En el Capítol I també es comenta l'efecte que els solvents orgànics provoquen en la migració electroforètica.

A la segona part de la Memòria es presenten i es discuteixen els resultats obtinguts durant el transcurs de la Tesi, sobre la base dels fonaments teòrics comentats a la primera part. El Capítol II presenta i avalua el model desenvolupat per a l'estimació de la variació del pH en fases mòbils hidroorgàniques amortidores del pH que tinguin acetonitril o metanol com a modificador orgànic. En el Capítol III s'usa el model presentat en el capítol anterior per interpretar i estimar la retenció cromatogràfica d'anàlits amb propietats àcid/base en cromatografia de líquids d'alta eficàcia en fase invertida. En el Capítol IV es caracteritza el nitrometà com a solvent orgànic usat en electroforesi capil·lar no aquosa, i s'afronta el problema analític de separar un fàrmac dels seus metabòlits principals usant diferents solvents orgànics en electroforesi capil·lar no aquosa.

La tercera part de la Memòria correspon a les conclusions generals, en què s'enumeren de forma resumida els aspectes més significatius dels estudis duts a terme.

Finalment, en els annexos, es poden trobar els articles publicats durant el transcurs de la Tesi Doctoral. El primer bloc, que comprèn els articles de l'*I* al *IV*, fa referència als estudis realitzats en relació a les fases mòbils en cromatografia de líquids. A l'article *I* es desenvolupa el model que caracteritza la variació del pH en fases mòbils acetonitril/tampó aquós en funció del contingut de modificador orgànic, la naturalesa i concentració del sistema amortidor, i el pH de la solució aquosa. A l'article *II* es posa de manifest la conveniència de mesurar el pH en la fase mòbil hidroorgànica, en lloc de fer-ho a la solució amortidora aquosa, i es presenta un model basat en l'estimació del pK_a d'anàlits amb propietats àcid/base i del pH de fases

mòbils acetonitril/aigua que permet predir els temps de retenció cromatogràfics d'anàlits ionitzables. L'article *III* estableix un model, similar al presentat a l'article *I*, que permet estimar la variació del pH en fases mòbils metanol/tampó aquós. Finalment l'article *IV*, que tanca aquest primer bloc, és un recopilatori dels models que permeten estimar el pH de fases mòbils acetonitril/aigua i metanol/aigua. Aquest article de revisió es va escriure per satisfer la demanda de l'editor de "Separation and Purification Reviews", que va considerar que el treball desenvolupat en aquesta Tesi era de gran interès pels lectors de l'esmentada revista. El segon bloc, que inclou els articles *V* i *VI*, fa referència a l'ús de solvents orgànics en electroforesi capil·lar. A l'article *V* es caracteritza el nitrometà com a solvent adequat per electroforesi capil·lar no aquosa (NACE), i al *VI* es mostra una aplicació pràctica de la NACE en la resolució d'un problema analític.

